

Membandingkan Kesan antara Fraksi-kaya Tokotrienol, Kalsium dan Estrogen Terhadap Metabolisme Tulang Tikus Terovariektomi

(Comparing the Effects of Tocotrienol-rich Fraction, Calcium and Estrogen on Bone Metabolism in Ovariectomized Rats)

NORLIZA MUHAMMAD*, SURAYYA RAZALI, AHMAD NAZRUN SHUID,
NORAZLINA MOHAMED & IMA NIRWANA SOELAIMAN

ABSTRAK

Beberapa kajian sebelum ini menunjukkan penglibatan pengaruh tekanan pengoksidaan dalam patogenesis osteoporosis. Justeru agen antioksidan berpotensi untuk digunakan bagi merawat dan mencegah osteoporosis. Dalam kajian ini, vitamin E sawit dalam bentuk fraksi-kaya tokotrienol ('tocotrienol-rich fraction', TRF) telah digunakan. Perbandingan dibuat antara rawatan TRF, kalsium dan estrogen terhadap parameter histomorfometri struktur tulang, kandungan kalsium dan kekuatan biomekanikal tulang pada tikus betina terovariektomi. Sebanyak 48 ekor tikus betina Sprague-Dawley dibahagikan kepada enam kumpulan, iaitu kawalan asas, sham, ovariektomi (OVX) dan kumpulan ovariektomi yang diberi rawatan samada kalsium, estrogen atau TRF. Rawatan diberikan secara paksaan oral selama dua bulan. Berdasarkan ujian histomorfometri tulang, tikus-tikus terovariektomi yang diberi kalsium, estrogen atau TRF menunjukkan peningkatan isi padu trabekular dan pengurangan jarak antara tulang trabekular secara signifikan berbanding dengan tikus kawalan ovariektomi. Disamping itu, rawatan estrogen dan TRF meningkatkan ketebalan trabekular secara signifikan berbanding dengan kumpulan OVX dan kalsium. Melalui ujian kandungan kalsium tulang, tikus yang diberi rawatan kalsium mempunyai aras kandungan kalsium dalam vertebra lumbar ke-empat yang lebih tinggi berbanding dengan kumpulan sham dan OVX. Kesimpulannya, rawatan kalsium, estrogen dan TRF berupaya memberikan kesan positif terhadap struktur tulang trabekular. TRF dan estrogen mampu mencegah penipisan tulang. Rawatan kalsium meningkatkan kandungan kalsium tulang, namun ia tidak berupaya untuk mencegah penipisan tulang.

Kata kunci: Estrogen; histomorfometri struktur tulang; mineral tulang; osteoporosis; tokotrienol; vitamin E

ABSTRACT

Previous studies showed the role of oxidative stress in the pathogenesis of osteoporosis. Thus antioxidant agents have the potential to be used in the treatment and prevention of osteoporosis. In this study, vitamin E in the form of tocotrienol-rich fraction (TRF) was used. Comparison of the effects of treatments was made among TRF, calcium and estrogen. A total of 48 female Sprague-Dawley rats were divided into six groups: baseline, sham-operated, ovariectomized control and ovariectomized given calcium, estrogen or TRF. The treatment agents were administered via oral gavage for two months. Bone histomorphometry showed that treatment with either calcium, estrogen or tocotrienol was able to increase the trabecular volume and reduce the distance between the trabecular bone significantly compared with the ovariectomy control group. Treatment with either estrogen or tocotrienol showed significant increase in the thickness of the trabecular compared with the control group. Based on the calcium content test, supplementation with calcium increased the levels of calcium content in the fourth vertebral lumbar significantly compared with the sham and ovariectomy group. In conclusion, calcium, estrogen and tocotrienol had positive effects on the trabecular bone. However, tocotrienol was more superior to calcium or estrogen in preventing bone loss in postmenopausal osteoporosis. Tocotrienol prevented bone thinning and loss of volume without the side effects as estrogen. Although calcium can improve the bone calcium content, still, it was unable to prevent bone thinning.

Keywords: Bone mineral content; estrogen; osteoporosis; structural histomorphometry; tocotrienol; vitamin E

PENDAHULUAN

Osteoporosis ialah penyakit tulang yang dicirikan dengan pengurangan kekuatan dan jisim tulang (Nancy 2005). Kedua-dua ciri ini menyebabkan seseorang individu itu berisiko untuk mengalami kepatahan tulang terutama pada tulang pinggul dan tulang belakang. Terdapat banyak faktor yang boleh mendorong kepada kepatahan

tulang. Antaranya ialah kekurangan hormon estrogen, jisim tulang yang rendah, penggunaan dadah, merokok, aktiviti fizikal yang rendah, imobilisasi, pengambilan diet yang rendah kalsium dan vitamin D, saiz badan yang kecil dan mempunyai sejarah keluarga yang pernah mengalami kerapuhan tulang (Nancy 2005). Penggunaan dadah atau ubat-ubatan yang boleh menyumbang

kepada osteoporosis adalah seperti kortikosteroid, glukokortikoid, hormon tiroid, antikonvulsan dan agen heparin (Sellmeyer & Shoback 2006). Osteoporosis sekunder juga boleh terjadi pada individu yang mengalami hiperkortisolisme (sindrom Cushing), hipertiroidisme dan hiperparatiroidisme. Kekurangan hormon estrogen berlaku selepas menopause. Pengurangan aras estrogen ini meningkatkan tukar ganti tulang dan kehilangan jisim tulang (Hazenberget al. 2007).

Terapi estrogen sering diambil oleh wanita selepas menopause. Estrogen berupaya mengawal sintesis dan rembesan faktor pertumbuhan bagi sel tulang. Selain itu, estrogen juga dapat mengurangkan tukar ganti tulang, kadar resorpsi tulang dan keretakan tulang (osteoporosis) bagi wanita pasca-menopause (Steven et al. 2010). Namun, estrogen mempunyai beberapa kesan sampingan. Antaranya ialah menyebabkan angin ahmar (Amir et al. 2008) dan kanser-kanser endometrium dan payu dara (Amir et al. 2008) serta vagina (Henderson et al. 1988).

Suplementasi kalsium didapati dapat mengurangkan kadar kehilangan tulang kortikal pada lewat menopause (Reid et al. 1995). Walau bagaimanapun, kalsium tidak dapat mencegah kehilangan tulang pada tahun pertama selepas menopause (Kessenich 2007). Menurut Bolland et al. (2008), suplementasi kalsium pada wanita pasca-menopause dikaitkan dengan risiko serangan jantung jika pengambilannya tidak seimbang.

Vitamin E merupakan vitamin yang larut lemak dan terdapat dalam dua bentuk biologi aktif, iaitu tokoferol dan tokotrienol (60-70%). Tokotrienol telah terbukti dapat mencegah hidrogen peroksida-aruhan neurotoksisiti berbanding alfa-tokoferol (Osakada et al. 2003). Vitamin E didapati sangat efektif dalam mencegah resorpsi tulang terhadap pelbagai model osteoporosis seperti tikus diovariectomy (Norazlina et al. 2002), tikus aruhan deksametason (Ima Nirwana & Fakhrurazi 2002), tikus aruhan besi-nitritotriasetat (Ahmad et al. 2005) dan tikus aruhan nikotin (Hapidin et al. 2007). Walau bagaimanapun, setakat ini belum terdapat kajian yang membandingkan antara rawatan tokotrienol (vitamin E) dengan rawatan anti-osteoporosis lain seperti estrogen dan kalsium.

Dalam kajian ini, Vitamin E sawit dalam bentuk fraksi-kaya tokotrienol ('tocotrienol-rich fraction', TRF) telah digunakan. Objektif penyelidikan ini ialah untuk membandingkan kesan antara rawatan TRF, kalsium dan estrogen terhadap parameter histomorfometri struktur tulang, kandungan kalsium serta kekuatan biomekanikal tulang pada tikus betina terovariectomy, iaitu model haiwan yang paling sesuai bagi osteoporosis pascamenopause.

KAEDAH

Sebanyak 48 ekor tikus betina Sprague Dawley dibahagikan secara rawak kepada enam kumpulan yang terdiri daripada lapan ekor tikus untuk setiap kumpulan. Kumpulan pertama ialah kumpulan kawalan asas (KAWALAN) dengan tikus di dalam kumpulan ini dibunuh pada permulaan kajian.

Kumpulan kedua ialah tikus yang dibedah sham (SHAM) dengan bahagian abdomen tikus dibedah tanpa dibuang ovari. Kumpulan ketiga ialah kumpulan ovariectomy (OVX) yang bertindak sebagai kawalan negatif. Tikus di dalam tiga kumpulan selebihnya juga diovariectomy tetapi menerima agen rawatan yang berbeza iaitu 15 mg/kg kalsium (OVX+K), 64.5 mg/kg estrogen (OVX+E) atau 60 mg/kg Vitamin E-kaya tokotrienol (Tocotrienol-rich fraction, TRF) (OVX+T). Kerja-kerja penyelidikan ini telah diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Penggunaan Haiwan UKM (UKMAEC: PP/FAR/2010/NORLIZA/14-JULY/315-JULY-2010-JUNE 2011).

PENYEDIAAN AGEN RAWATAN

TRF diperolehi dari Carotech Bhd (Ipoh, Malaysia) dan terdiri daripada 24.67% α -tokotrienol, 38.96% γ -tokotrienol, 4.55% δ -tokotrienol dan 20.11% α -tokoferol. Estrogen diperolehi dalam bentuk tablet Premarin® (Wyeth-Ayerts, Kanada) dengan setiap tablet mengandungi 0.625 mg estrogen terkonjugat. TRF dan tablet Premarin® yang ditumbuk dicairkan di dalam minyak zaiton (Bertolli Classico, Italy) yang bertindak sebagai 'vehicle'. Kalsium klorida juga dilarutkan di dalam minyak zaiton. Tikus kajian menerima agen rawatan yang berasingan secara oral gavage yang diberi pada waktu yang sama setiap hari selama lapan minggu. Tikus-tikus sham dan kawalan ovariectomy diberi 'vehicle' setiap hari untuk tempoh yang sama. Dosis kalsium, estrogen dan tokotrienol yang digunakan dalam uji kaji ini adalah berdasarkan kajian kami yang terdahulu (Fathilah et al. 2012; Norazlina et al. 2002).

PENYEDIAAN SAMPEL TULANG

Selepas tamat tempoh rawatan, kesemua tikus dibunuh secara dislokasi serviks. Kemudian, tikus dibedah bagi mengeluarkan tulang femur kiri serta vertebra lumbar keempat (L4) dan ke-lima (L5). Tulang femur kiri digunakan untuk ujian histomorfometri manakala vertebra L4 dan L5 digunakan untuk uji kaji penentuan kandungan kalsium tulang.

HISTOMORFOMETRI STRUKTUR TULANG

Tulang femur kiri ditetapkan di dalam 10% formalin penimbal neutral sebelum proses dehidrasi dilakukan. Dehidrasi tulang dimulakan dengan rendaman di dalam 70% alkohol, 90% alkohol dan 100% alkohol selama 24 jam bagi setiap rendaman. Seterusnya, proses infiltrasi dilakukan dengan merendamkan tulang di dalam larutan Resin A Osteo-Bed (Polyscience Inc., USA) dan 100% alkohol selama 24 jam, diikuti dengan rendaman tulang di dalam larutan infiltrasi yang telah dicampurkan 100 mL larutan Resin A Osteo-Bed dengan 1.4 g benzoil peroksida selama 24 jam. Proses pembenaman dilakukan dengan merendamkan tulang di dalam larutan pembenaman yang telah dicampurkan 100 mL Resin A Osteo-Bed dengan 3.5 g benzoil peroksida. Botol-botol yang berisi tulang ini diletakkan di dalam mandian air pada suhu 37°C

sehingga larutan pembenaman menjadi pepejal. Sampel tulang femur dihiris setebal 8 sehingga 10 μm dengan menggunakan mesin mikrotom LEICARM2235. Seterusnya, slaid diwarnakan dengan pewarnaan Von Kossa (Sheehan & Hrapchak 1980). Kajian dilakukan menggunakan penganalisa imej Nikon ECLIPSE 80i dan program komputer Image-Pro Plus 5.0. Parameter struktur histomorfometri tulang yang diukur adalah berdasarkan Parfitt et al. (1987).

KEKUATAN BIOMEKANIKAL TULANG

Diameter tulang femur kanan diukur dan dicatatkan. Kekuatan biomekanikal tulang diukur menggunakan mesin Instron di Institut Molekular Sel, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi. Ujian kelenturan konfigurasi tiga penjur dilakukan. Bagi konfigurasi ini, suatu beban dihasilkan di tengah-tengah kedudukan tulang. Antara parameter yang diukur termasuklah 'maximum load', 'maximum stress', 'strain' dan 'Young's Modulus'.

KANDUNGAN KALKSIUM TULANG

Pengukuran kandungan kalsium tulang dilakukan menggunakan kaedah Norazlina et al. (2002). Lengku piawai disediakan menggunakan stok kalsium dan lantanum klorida. Kandungan kalsium tulang diukur menggunakan spektrometri penyerapan atom (AAS) dalam unit mg/L.

ANALISIS STATISTIK

Data dianalisis menggunakan perisian SPSS, 'Statistical Package for Social Science' versi 16.0. Taburan data yang diperoleh diuji kenormalannya menggunakan ujian Shapiro-Wilk. Jika data yang diperoleh tertabur secara normal, maka, ujian analisis varians (ANOVA) digunakan diikuti dengan ujian Tukey Post-Hoc. Jika data tidak tertabur secara normal, ujian Kruskal-Wallis dan ujian Mann-Whitney digunakan. Keputusan ditunjukkan

dalam bentuk purata \pm ralat piawai purata (S.E.M). Nilai signifikan $p < 0.05$ digunakan dalam semua ujian statistik.

HASIL

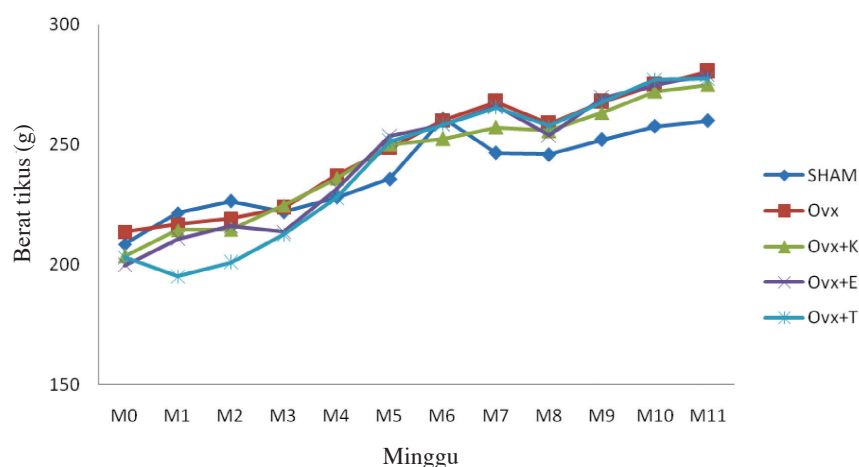
BERAT BADAN TIKUS KAJIAN

Tikus kajian tidak menunjukkan perbezaan berat badan yang signifikan sebelum rawatan diberikan. Sepanjang tempoh rawatan, secara keseluruhannya, didapati bahawa semua kumpulan tikus menunjukkan peningkatan berat badan pada setiap minggu (Rajah 1). Walau bagaimanapun, pada peringkat akhir kajian, tikus dalam kumpulan kawalan ovariektomi menunjukkan peningkatan berat badan yang signifikan berbanding dengan kumpulan sham. Sebaliknya, berat tikus terovariektomi yang menerima rawatan kalsium, estrogen atau TRF langsung tidak menunjukkan perbezaan dengan kumpulan sham (Rajah 2).

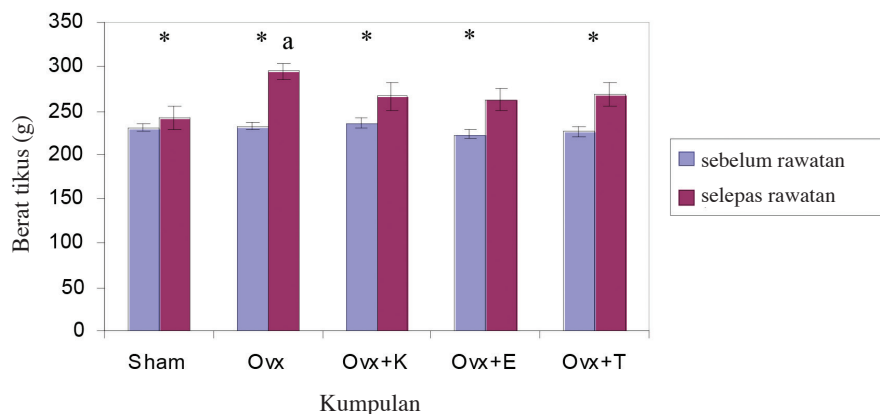
HISTOMORFOMETRI TULANG

Tikus terovariektomi yang diberi rawatan kalsium, estrogen atau TRF mempunyai isi padu tulang trabekular yang lebih tinggi ('bone volume', BV/TV) berbanding dengan tikus OVX (Rajah 3). Isi padu tulang trabekular tikus-tikus OVX+K, OVX+E dan OVX+T tidak berbeza secara signifikan berbanding dengan tikus-tikus sham (Rajah 4).

Rawatan estrogen atau TRF berjaya mengekalkan ketebalan trabekular ('trabecular thickness', Tb.Th) pada tikus-tikus terovariektomi. Walau bagaimanapun, tikus-tikus yang menerima rawatan kalsium mempunyai ketebalan tulang trabekular yang sama seperti tikus-tikus OVX (Rajah 4). Dalam pada itu, ketiga-tiga agen rawatan berjaya mengurangkan jarak pemisahan trabekular ('trabecular separation', Tb.S) akibat ovariektomi (Rajah 6) walaupun tiada perbezaan signifikan yang dapat diperhatikan pada parameter bilangan trabekular ('trabecular number', Tb.N) (Rajah 5).

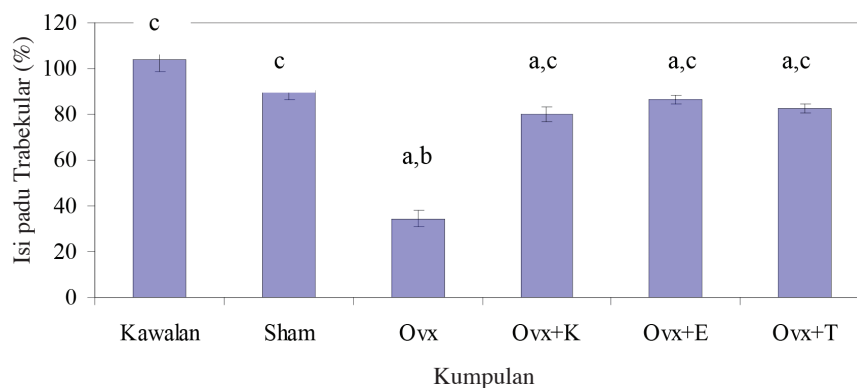


RAJAH 1. Perubahan berat badan semua kumpulan tikus sepanjang 11 minggu tempoh kajian. OvX: ovariektomi, OvX+K: Ovariektomi dan diberi rawatan kalsium, OvX+E: Ovariektomi dan diberi rawatan estrogen, OvX+T: Ovariektomi dan diberi rawatan TRF

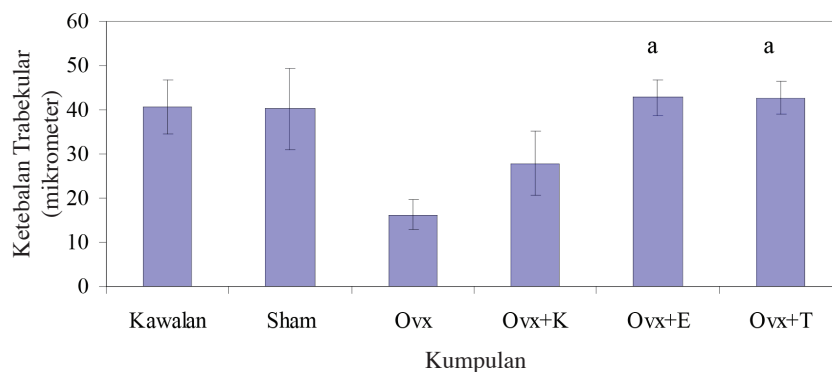


RAJAH 2. Perbandingan berat badan tikus antara kumpulan sebelum dan selepas tempoh rawatan. Ovx: ovariectomy, Ovx+K: Ovariectomy and given calcium treatment, Ovx+E: Ovariectomy and given estrogen treatment, Ovx+T: Ovariectomy and given TRF treatment. Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm SEM.

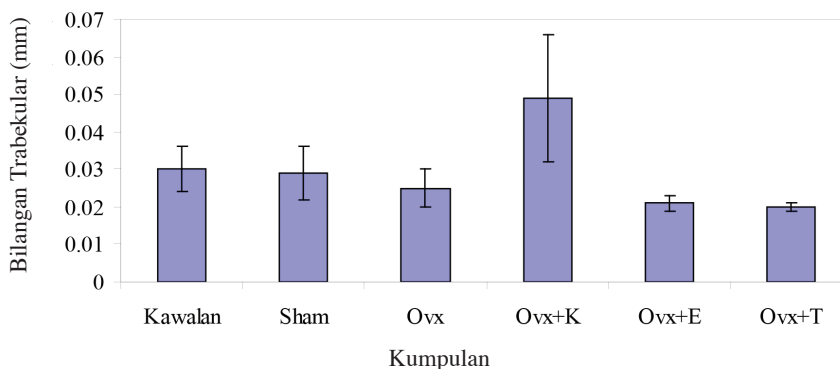
Huruf (a) menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara berat tikus selepas rawatan dengan kumpulan sham. Tanda (*) menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) antara berat tikus sebelum dan selepas rawatan bagi kumpulan yang sama



RAJAH 3. Perbandingan isi padu trabekular antara kumpulan. Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm SEM. Ovx: ovariectomy, Ovx+K: Ovariectomy and given calcium treatment, Ovx+E: Ovariectomy and given estrogen treatment, Ovx+T: Ovariectomy and given TRF treatment. Huruf (a) menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) dengan kumpulan Kawalan asas. Huruf (b) menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) dengan kumpulan Sham. Huruf (c) menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) dengan kumpulan OVX



RAJAH 4. Perbandingan ketebalan trabekular antara kumpulan. Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm SEM. Ovx: ovariectomy, Ovx+K: Ovariectomy and given calcium treatment, Ovx+E: Ovariectomy and given estrogen treatment, Ovx+T: Ovariectomy and given TRF treatment. Huruf (a) menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) dengan kumpulan OVX



RAJAH 5. Perbandingan bilangan trabekular antara kumpulan. Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm SEM. Ovx: ovariectomy, Ovx+K: Ovariectomy and given calcium treatment, Ovx+E: Ovariectomy and given estrogen treatment, Ovx+T: Ovariectomy and given TRF treatment

KANDUNGAN KALKSIUM VERTEBRA LUMBAR DAN UJIAN BIOMEKANIKAL TULANG

Kesemua kumpulan tikus tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan pada kandungan kalsium untuk vertebra lumbar ke-lima (L5). Namun, tikus-tikus OVX+K menunjukkan peningkatan aras kandungan kalsium lumbar ke-empat (L4) yang signifikan berbanding dengan kumpulan sham dan OVX (Rajah 7).

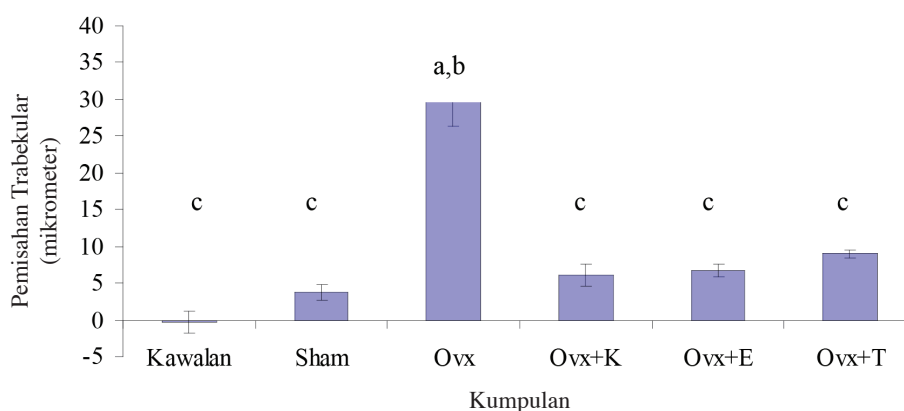
Melalui ujian kekuatan biomekanikal tulang, didapati bahawa kesemua parameter yang diukur tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan dengan mana-mana kumpulan (data tidak ditunjukkan).

PERBINCANGAN

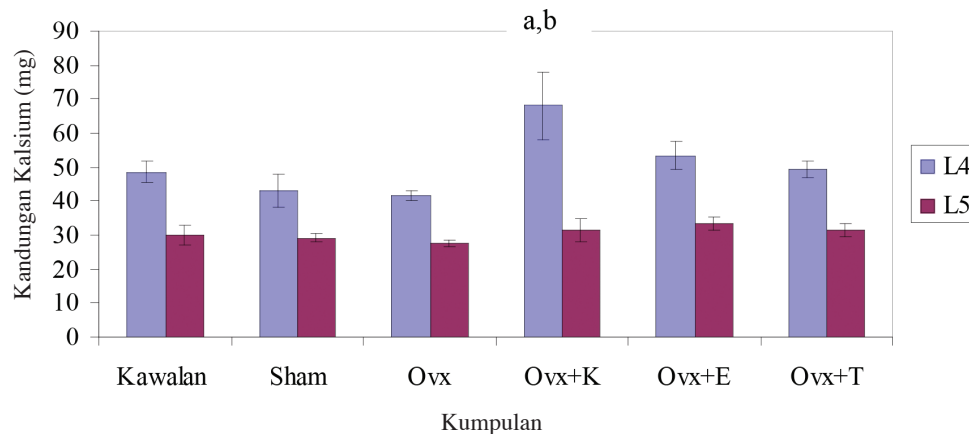
Tikus terovariectomy akan mengalami penurunan aras estrogen di dalam badan. Salah satu fungsi estrogen ialah mengawal pengambilan makanan melalui tindakan leptin (Torto et al. 2006). Leptin ialah protein 14-kDa yang dikodkan oleh gen *ob* dan dihasilkan oleh tisu adipos putih. Leptin bertindak pada nukleus hipotalamus bagi

mengawal pengambilan makanan, pengeluaran tenaga, pertumbuhan dan pematangan seksual (Casaneuva & Digueze 1999). Kekurangan estrogen menyebabkan pengurangan aras leptin di dalam tubuh (Ainslie et al. 2001), seterusnya merangsang hipotalamus memberikan isyarat kepada tubuh untuk meningkatkan pengambilan makanan. Walau bagaimanapun, rawatan kalsium, estrogen ataupun TRF didapati mampu mengawal pertambahan berat badan akibat daripada kekurangan estrogen seperti yang dibuktikan di dalam kajian ini. Kesan agen rawatan ini terhadap perubahan berat badan adalah serupa dengan kesan pemberian estrogen pada tikus terovariectomy (Shinoda et al. 2002).

Seperti yang telah dibuktikan dalam kajian lain (Li et al. 2009), tikus terovariectomy mempunyai kadar tukar ganti tulang yang tinggi dengan kadar pembentukan dan resorpsi tulang meningkat. Namun, kadar resorpsi melebihi kadar pembentukan tulang, justeru menyebabkan penurunan isi padu tulang trabekular (BV/TV). Di samping BV/TV yang rendah, tikus terovariectomy juga mempunyai trabekular yang nipis dan sedikit bilangannya, manakala



RAJAH 6. Perbandingan pemisahan trabekular antara kumpulan. Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm SEM. Ovx: ovariectomy, Ovx+K: Ovariectomy and given calcium treatment, Ovx+E: Ovariectomy and given estrogen treatment, Ovx+T: Ovariectomy and given TRF treatment. Huruf (a) menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) dengan kumpulan Kawalan. Huruf (b) menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) dengan kumpulan Sham. Huruf (c) menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) dengan kumpulan OVX



RAJAH 7. Perbandingan kandungan kalsium lumbar ke-empat dan ke-lima antara kumpulan. Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm SEM. Ovx: ovariectomy, Ovx+K: Ovariectomy and given calcium treatment, Ovx+E: Ovariectomy and given estrogen treatment, Ovx+T: Ovariectomy and given TRF treatment. L4:vertebra lumbar ke-empat, L5:vertebra lumbar ke-lima. Huruf (a) menunjukkan perbezaan signifikan ($p<0.05$) dengan kumpulan sham. Huruf (b) menunjukkan perbezaan signifikan ($p<0.05$) dengan kumpulan OVX

jarak antara satu trabekular ke satu trabekular yang lain adalah jauh (Bagi et al. 1997). Walau bagaimanapun, hasil kajian kami ini sedikit berbeza dengan tikus-tikus kumpulan OVX menunjukkan penurunan pada ketebalan trabekular (Tb.Th) dan peningkatan jarak pemisahan antara trabekular (Tb.Sp) tetapi tiada perubahan pada bilangan trabekular (Tb.N). Ini menunjukkan bahawa tikus terovariectomy dalam kajian kami mengalami kehilangan tulang melalui penipisan dan perforasi trabekular tanpa menjejaskan bilangannya. Penipisan trabekular pada tikus yang diovariectomy adalah disebabkan oleh mekanisme kompensasi dengan elemen plat tulang ditukar kepada rod. Akibatnya, terjadilah perforasi tulang trabekular dan kehilangan hubungan antara tulang tanpa mengubah bilangan trabekular (Gal-Mascovici & Popovtzer 2005).

Rawatan tikus terovariectomy sama ada menggunakan kalsium, estrogen ataupun TRF didapati meningkatkan isi padu tulang trabekular berbanding dengan tikus-tikus kumpulan OVX. Nilai BV/TV untuk ketiga-tiga kumpulan rawatan tidak berbeza secara signifikan. Namun, kumpulan OVX+E dan OVX+T mempunyai trabekular yang lebih tebal berbanding dengan tikus-tikus yang diberi rawatan kalsium. Ini menunjukkan bahawa estrogen dan TRF mampu memberi kesan yang lebih baik terhadap tulang trabekular berbanding kalsium.

Dalam kajian Ahmad et al. (2010), γ -tokotrienol memberikan nilai pemisahan trabekular (Tb.Sp) yang lebih rendah berbanding dengan kumpulan α -tokoferol dan kawalan. Nilai Tb.Sp yang rendah bermaksud susunan trabekular adalah lebih rapat antara satu sama lain. Ini menggambarkan bahawa tulang itu adalah padat dan kukuh. Struktur tulang trabekular tikus yang diberikan suplementasi isomer vitamin E terutamanya γ -tokotrienol adalah lebih padat dan tumpat berbanding tulang tikus yang tidak diberikan suplementasi isomer vitamin E.

Ujian kekuatan biomekanikal tulang tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan antara kesemua

kumpulan tikus. Ia mungkin disebabkan oleh tempoh rawatan yang singkat atau bilangan tikus yang kurang. Rawatan tokotrienol dan estrogen mengambil masa sekurang-kurangnya antara empat hingga enam bulan (Ahmad et al. 2010; Kolios et al. 2009) untuk memberikan kesan positif terhadap kekuatan biomekanikal tulang.

Dalam kajian ini rawatan kalsium memberikan aras kandungan kalsium yang lebih tinggi pada vertebra L4 berbanding rawatan estrogen dan TRF. Ini adalah disebabkan oleh peranan kalsium di dalam struktur tulang. Kalsium merupakan mineral penting dalam pembentukan tulang. Oleh itu, pemberian kalsium pada dos optimum terhadap tikus terovariectomy dapat meningkatkan lagi kandungan kalsium pada vertebra lumbar. Walau bagaimanapun, rawatan kalsium didapati tidak meningkatkan kandungan kalsium tulang pada vertebra L5. Ini mungkin disebabkan oleh faktor saiz yang berbeza dengan vertebra L5 yang bersaiz lebih besar berbanding vertebra L4 memerlukan masa yang lebih panjang bagi kalsium untuk memberikan kesan positif. Rawatan TRF atau estrogen dalam kajian kami ini tidak memberikan kesan yang signifikan terhadap kandungan mineral tulang. Ini berbeza dengan kajian yang terdahulu (Norazlina et al. 2002), dengan pemberian 60 mg/kg vitamin E sawit berupaya meningkatkan kandungan kalsium tulang femur pada tikus terovariectomy. Estrogen pula dikatakan mampu mempengaruhi perembesan kalsium endogenus pada tikus yang sedang membesar (Drapper et al. 1999; Morris et al. 1995). Namun, penyelidik lain juga mendapati bahawa rawatan estrogen pada tikus terovariectomy tidak memberikan kesan terhadap kandungan kalsium tulang (David et al. 2005).

KESIMPULAN

Rawatan kalsium, estrogen dan TRF memberikan kesan yang positif terhadap struktur tulang trabekular. Rawatan TRF dilihat sebagai modaliti terbaik untuk mencegah

kehilangan tulang akibat kekurangan hormon estrogen berbanding dengan rawatan estrogen atau kalsium. TRF mampu mencegah penipisan dan kehilangan isi padu tulang tanpa memberikan kesan sampingan semudarat estrogen. Walaupun rawatan kalsium berupaya meningkatkan kandungan kalsium tulang, namun ia tidak berjaya mencegah penipisan tulang.

RUJUKAN

- Ahmad, N.S., Khalid, B.A.K., Luke, D.A. & Ima-Nirwana, S. 2005. Tocotrienol offers better protection than tocopherol from free radical induced damage on rat bone. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* 32: 761-770.
- Ahmad, N.S., Zulfadli, M., Norazlina, M., Norliza, M. & Ima Nirwana, S. 2010. Vitamin E exhibits bone anabolic actions in normal male rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 28(2): 149-156.
- Ainslie, D.A., Morris, M.J., Wittert, G., Turnbull, H., Proietto, J. & Thorburn, A.W. 2001. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 25: 1680-1688.
- Amir, Q., Snow, V., Shekelle, P., Hopkins, R., Forciea, M.A. & Owens, D.K. 2008. Pharmacologic treatment of low bone density or osteoporosis to prevent fractures: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Annals of Internal Medicine* 149: 404-415.
- Bagi, C.M., Wilkie, D., Georgelos, K., Williams, D. & Bertolini, D. 1997. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. *International Bone and Mineral Society* 21(3): 261-267.
- Casanueva, F.F. & Dieguez, C. 1999. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front. Neuroendocrinology* 20: 317-363.
- Draper, C.R., Dick, I.M. & Prince, R.L. 1999. The effect of estrogen deficiency on calcium balance in mature rats. *Calcified Tissue International* 64: 325-328.
- Fathilah, S.N., Ahmad, N.S., Norazlina, M., Norliza, M. & Ima Nirwana, S. 2012. Labisia pumila protects the bone of estrogen-deficient rat model: A histomorphometric study. *Journal of Ethnopharmacology* 142(1): 294-299.
- Gal-Moscovici, A.M. & Popovtzer, M.M. 2005. Treatment of osteoporotic ovariectomized rats with 24, 25(OH)2D3. *European Journal of Clinical Investigation* 35: 375-379.
- Hapidin, H., Othman, F., Soelaiman, I.N., Shuid, A.N. & Luke, D.A. 2007. Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats. *Journal of Bone & Mineral Metabolism* 25: 93-98.
- Hazenberg, J.G., Taylor, D. & Lee, T.C. 2007. The role of osteocytes and bone microstructure in preventing osteoporotic fractures. *Osteoporosis International* 18: 1-8.
- Henderson, B.E., Ross, R. & Bernstein, L. 1988. Estrogens as a cause of human cancer. *The Richard and Hinda Rosenthal Cancer Research* 48: 246-253.
- Ima-Nirwana, S. & Fakhrurazi, H. 2002. Palm vitamin E protects bone against dexamethasone-induced osteoporosis in male rats. *Medical Journal of Malaysia* 57(2): 133-141.
- Kessenich, C.R. 2007. Calcium and vitamin D supplementation for postmenopausal bone health. *The Journal for Nurse Practitioners* 3(3): 155-159.
- Kolios, L., Hoerster, A.K., Sehmisch, S., Malcherek, M.C., Rack, T., Tezval, M., Seidlova-Wuttke, D., Wuttke, W., Stuermer, K.M. & Stuermer, E.K. 2009. Do estrogen and alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied as osteoporosis prophylaxis? *Calcified Tissue International* 86(1): 23-32.
- Li, X., Ominsky, M.S., Warmington, K.S., Morony, S., Gong, J., Cao, J., Gao, Y., Shalhoub, V., Tipton, B., Haldankar, R., Chen, Q., Winters, A., Boone, T., Geng, Z., Niu, Q.T., Ke, H.Z., Kostenuik, P.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. & Paszty, C. 2009. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone & Mineral Research* 24: 578-588.
- Morris, H.A., O'Loughlin, P.D., Mason, R.A. & Schulz, S.R. 1995. The effect of oophorectomy on calcium homeostasis. *Bone* 17(4): 169S-174S.
- Nancy, E.L. 2005. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 194(2): S3-S11.
- Norazlina, M., Soelaiman, I., Mohd, T.A.G. & Khalid, B.A.K. 2002. Tocotrienols are needed for normal bone calcification in growing female rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 11(3): 194-199.
- Osakada, F., Hashino, A. & Kume, T. 2003. Neuroprotective effects of α -tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. *European Journal of Pharmacology* 465: 15-22.
- Parfit, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M. & Recker, R.R. 1987. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units. *Journal of Bone & Mineral Research* 6: 595-610.
- Reid, I.R., Ames, R.W., Evans, M.C., Gamble, G.D. & Sharpe, S.J. 1995. Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women: A randomized controlled trial. *American Journal of Medicine* 98: 331-335.
- Sheehan, D. & Hrapchak, B. 1980. *Theory and Practice of Histotechnology*. Ed. Ke-2. Elsevier Health Sciences New York. Hlmm. 226-227.
- Shinoda, M., Latour, M.G. & Lavoie, J.M. 2002. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *International Journal of Obesity* 26: 335-343.
- Steven, T.H., Leder, B. & Pinkerton, J. 2010. Breast cancer and bone loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95(70): 212-220.
- Torto, R., Boghossian, S., Dube, M.G., Kalra, P.S. & Kalra, S.P. 2006. Central leptin gene therapy blocks ovariectomy-induced adiposity. *Obesity* 14: 1312-1319.

Jabatan Farmakologi
Fakulti Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: norliza_ssp@yahoo.com

Diserahkan: 27 Oktober 2011

Diterima: 19 April 2013